

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

А.В.Бледнов

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФОРМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ

Витебский государственный
медицинский университет

В статье исследуется современное состояние проблемы поиска оптимальных носителей и методов иммобилизации ферментов и предлагается оригинальное решение проблемы. В результате проведенных исследований создано семейство комбинированных перевязочных средств для протеолитического очищения ран. Исследовано сохранение активности трипсина после иммобилизации на носителях и его высвобождения в раневую среду.

ВВЕДЕНИЕ

Применение ферментов в медицине резко расширило арсенал эффективных лекарственных средств. Так, пепсин и панкреатические ферменты (трипсин, химотрипсин, липаза, амилаза) используются при заболеваниях пищеварительного тракта, которые сопровождаются недостаточностью этих ферментов, аспарагиназа — при некоторых формах лейкоза, рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза — при некоторых вирусных заболеваниях, трипсин, стрептокиназа, папаин — для удаления некротических тканей и гнойных масс с раневых поверхностей[1,3,4,6,8].

Известны уникальные свойства ферментов как биокатализаторов — их строгая специфичность и очень высокая эффективность. Каждый фермент катализирует расщепление или синтез только определенных химических связей, перенос определенных химических групп с доноров на акцепторы известной структуры. Количество каталитических актов, совершаемых молекулой фермента, состав-

ляет в среднем 10^3 — 10^5 операций в секунду. Однако когда речь идет о практическом применении выделенных из клеток ферментов, то общим недостатком их является нестабильность в условиях, в которых реализуются их каталитические свойства[7].

Ранее многие исследователи возлагали большие надежды на протеолитические ферменты, оказывающие некролитическое и противовоспалительное действие, что способствует быстрому, бескровному и безболезненному очищению гнойных ран. Для лечения гнойных ран предлагали использовать трипсин, химопсин, химотрипсин, террилитин (50—100 мг препарата на перевязку). Ферменты наносят непосредственно на рану или растворяют в гипертоническом растворе хлорида натрия. Однако в гнойной ране эффективность протеаз быстро и резко падает: через 15—20 мин они теряют активность вследствие расщепления тканевыми и сывороточными ингибиторами крови. В гнойной ране, как правило, развивается стойкий ацидоз (рН ниже 7,0), а ферменты наиболее активны в нейтральной среде[6].

В первой фазе раневого процесса выраженная воспалительная реакция в значительной мере обусловлена активностью ферментативных процессов. Чрезмерная их стимуляция может оказывать повреждающее действие на ткани и способствовать развитию инфекции, а лизируя некротические ткани, фермент одновременно повреждает раневой коагулят.

Некоторые исследователи предлагали предварительно определять активность протеаз в ране и в зависимости от полученных данных назначать либо протеазы, либо их ингибиторы.

Таким образом, применение кристаллических форм протеолитических ферментов не привело к существенному сокращению сроков лечения больных с местной гнойной инфекцией, а надежда на энзимотерапию как средство раннего удаления мертвых тканей не оправдалась. Определенное отрицательное значение имеет

и высокая стоимость протеолитических ферментов.

Разработка методов присоединения ферментов к нерастворимым матрицам — иммобилизация ферментов — привела к получению стабильных, длительно сохраняющих свою активность препаратов и резко расширила возможности применения их в медицине, сельском хозяйстве и промышленности. С этой точки зрения особый интерес представляют иммобилизованные протеолитические ферменты [2,4,8,11].

Протеолитические ферменты отличаются субстратной специфичностью. Известны ферменты, отщепляющие аминокислоты с N- или C-концов белковой молекулы — аминопептидазы и карбокси-пептидазы, и ферменты, расщепляющие внутренние пептидные связи — протеиназы. Протеиназы, в свою очередь, отличаются по способности узнавать и расщеплять пептидные связи между определенными аминокислотами. Так, трипсин расщепляет предпочтительно пептидные связи, в которые входят карбоксильные группы аргинина или лизина. Химотрипсин гидролизует преимущественно пептидные связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы аминокислот с ароматическими кольцами: фенилаланина, тирозина, триптофана, а также лейцина и метионина. Известны также дипептидазы, расщепляющие дипептиды разного состава.

Назначение протеолитических ферментов животных состоит, прежде всего, в том, чтобы расщеплять белки, поступающие с пищей в пищеварительный тракт. Этим целям служат гастрин, химозин, производимые клетками слизистой желудка, ферменты, синтезируемые поджелудочной железой (трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазы), и выделяемые с клетками кишечника аминопептидазы и дипептидазы. Известны внутриклеточные протеолитические ферменты катепсины А, В, С, D и Е, оптимум активности которых находится в кислой среде, и некоторые нейтральные протеиназы.

Внутриклеточные протеолитические ферменты гидролизуют избирательно собственные клеточные белки, структура и

функции которых нарушены; они полностью расщепляют все клеточные белки данной клетки, если клетка отмирает и белки ее утрачивают свою нативность. Образуемые при этом аминокислоты используются иными клетками организма. Катепсины находятся главным образом во внутриклеточных вакуолярных образованиях — лизосомах, в которых сохраняется кислая среда, оптимальная для этих ферментов. Белки, захваченные клеткой, оказываются заключенными в иные вакуоли — фагосомы (эндосомы). Слияние эндосом и лизосом обеспечивает переваривание захваченных клеткой белков. Протеолитические ферменты участвуют в реализации и других физиологических функций. Путем лимитированного протеолиза они превращают некоторые проферменты в ферменты, прогормоны в гормоны, отщепляя от таких функциональных белков маскирующие их активность пептиды; этот же механизм лежит в основе активации процесса свертывания крови. Плазма крови содержит несколько комплексных протеолитических систем, участвующих в защитных реакциях организма: система комплемента, свертывания крови, фибринолиза, калликреин-кининовая и ренин-ангиотензиновая системы. В каждой из них насчитывается большое количество протеиназ и их ингибиторов, которые в той или иной мере участвуют в воспалительных реакциях, в формировании противобактериального и противоопухолевого иммунитета. Эти системы связаны между собой теснейшим образом, так как имеют общие механизмы активации и контроля, для них характерна каскадность и необратимость действия. Вместе с микробными факторами система протеолиза является важным фактором в патогенезе токсемии при воспалительных заболеваниях. По мнению многих авторов, у данных больных происходит активация системы эндогенного протеолиза с одновременным снижением антипротеолитического потенциала.

Многие микроорганизмы, выделяя протеолитические ферменты во внешнюю среду, осуществляют этим способом внеклеточное пищеварение.

Способность протеиназ избирательно расщеплять преимущественно де-

натурированные белки позволяет эффективно использовать их растворимые и иммобилизованные препараты для ферментативного очищения раневых поверхностей от нежизнеспособных тканей и гнойных масс.

Протеолитические ферменты способны к автолизу и вследствие этого срок жизни, сохранения активности у большинства из них весьма ограничен. Именно это обстоятельство снижает эффективность их практического применения, хотя имеется ряд важных приложений их в практике. Протеолитические ферменты широко используются для приготовления сред, используемых в микробиологической и медицинской промышленности, в кожевенном и текстильном производстве, в молочной промышленности (в сыроделии), в мясной промышленности (для улучшения качества мяса).

В медицине протеолитические ферменты используют в качестве средств заместительной терапии при болезнях, ведущих к нарушению синтеза собственных протеиназ. Протеиназы (трипсин, химотрипсин, стрептокиназа, папаин) используют для лечения некротических и гнойных процессов. Действительно, эти ферменты, гидролизуя денатурированные белки некротических тканей и гнойных масс, способны очищать гнойные полости и раневые поверхности, ускоряя выздоровление.

Однако эффективность применения протеолитических ферментов во всех этих областях и, особенно, в медицине могла бы быть значительно выше, если бы в результате аутолиза не происходило их быстрой инактивации.

Возможность стабилизации активности протеиназ, которая возникла в связи с разработкой способов иммобилизации ферментов, открыла перспективы значительного повышения их эффективности, экономичности и расширения сферы применения [1,2].

Постоянно ведется поиск новых способов и носителей для иммобилизации. При анализе проблемы иммобилизации можно выделить следующие её компоненты: сохранение активности иммобилизованного фермента, выбор носителя, удоб-

ство применения полученной формы (простота проведения перевязки, удаление или биодеградация носителя) [9-14].

Известно несколько способов иммобилизации ферментов.

Их можно разделить по способам иммобилизации фермента, видам носителя и др. Она достигается: 1) путем адсорбции фермента на нерастворимых носителях; 2) включением ферментов в ячейки гелей при полимеризации их в присутствии фермента; 3) путем ковалентного присоединения фермента к нерастворимому носителю.

В качестве носителей используют органические и неорганические вещества, которые могут быть в твердом и гелеобразном виде.

В качестве нерастворимых полимерных материалов, к которым присоединяют ферментный белок, используют полиакриламид, модифицированные целлюлозы, полиэтиленгликоль, полистиролы, гранулы из кости цыпленка, полисахарид из сои, агарозу, декстран, нейлон, производные хитозана и другие полимеры. Разновидностью полимерного носителя является использование полимерных микрокапсульных подложек.

Из числа неорганических носителей матрицами для иммобилизации ферментов служат силикагели, гидроксиапатит, бентонит, стекло и другие материалы. Графит, пористый кварц и коллоидное золото также являются превосходными нетоксичными матриксами для иммобилизации ферментов. Для ковалентного присоединения ферментного белка к матрице используют его реакционноспособные аминные и карбоксильные группировки: OH-группы остатков серина и треонина, SH-группы цистеина [11].

Некоторые полимерные носители, обладающие реакционными группами, применяют без предварительной активации или прививки таких групп. Однако в большинстве случаев полимеры подвергаются предварительной модификации.

Так, полимеры, содержащие гидроксильные группы (целлюлоза, декстран, агароза), активируют хлористым циануром или его производными, например триазиновыми красителями. Такие активирован-

ные полимеры ковалентно присоединяют белковые молекулы за счет реакции с аминными группами белков. Целлюлозу модифицируют, превращая ее в аминоклетчатую (АЭ-целлюлозу) или в карбоксиметилцеллюлозу (КМ-целлюлозу) [12].

В некоторых случаях предварительной обработке подвергается фермент. Так, возможна обратимая иммобилизация химически модифицированного трипсина на активированной целлюлозе. Трипсин модифицировали диангидридом пиромеллитовой кислоты для увеличения отрицательно заряженной поверхности. Производные трипсина в отличие от немодифицированного трипсина связывались с активированной целлюлозой и количественно элюировались под действием 0,25 М натрия хлорида. Модифицированный трипсин, способный обратимо связываться с активированной целлюлозой, получали также путем обработки ангидридом янтарной кислоты [12].

Для присоединения фермента могут использоваться посредники, различного рода линкеры, спейсеры.

Для присоединения белков к АЭ-целлюлозе используют такой бифункциональный реагент, как глутаровый альдегид: одной своей альдегидной группой он реагирует с аминной группировкой АЭ-целлюлозы, а второй альдегидной группой — с аминной группировкой присоединяемого фермента. В результате этого фермент оказывается ковалентно «пришитым» к нерастворимой матрице.

Иммобилизация папаина на оксиде алюминия была выполнена посредством органофосфатных линкеров. При использовании ионных связей в качестве посредника могут использоваться иммобилизованные ионы металлов.

Препарат активного нерастворимого пепсина был получен посредством ковалентного связывания фермента с сукцинированным хитозаном с образованием амидной связи при использовании в качестве сшивающего агента карбодиимида. Фермент сохранил 80% своей специфической активности и был более устойчив при хранении, чем растворимый фермент [11].

Примером иммобилизации посредством полимеризации является аминоксилота, иммобилизованная на сополимере полиакрилата.

Гидрогели из поли[ди(метоксиэтоксиэтокси)фосфазена] (МЭЭФ) использовались для иммобилизации уреазы внутри перекрестно связанного матрикса. Твердые слои полимера МЭЭФ с диспергированной по всему матриксу уреазой или без фермента облучали гамма-излучением от радиоактивного изотопа кобальта для индукции перекрестного связывания полимера. Последующая обработка полимера водными средами приводила к впитыванию воды и набуханию с образованием гидрогелей [9].

Методами нековалентного связывания фермента является инкапсулирование липазы в мицеллярные частицы в органической среде, иммобилизация каталазы на антителах, сорбированных угольной тканью, иммобилизации биологически активных материалов в слое адсорбирующего полимера толщиной 80-500 нм.

В результате иммобилизации, по данным разных авторов, сохранялось от 50 до 90% активности фермента. В зависимости от вида иммобилизации, иммобилизованный фермент может приобретать высокую термостабильность, может быть использован многократно.

Самопереваривание протеолитического фермента в результате иммобилизации его на твердом носителе резко снижается, иммобилизованные протеиназы обладают повышенной устойчивостью к термической и химической денатурации, что также способствует длительному сохранению их активности.

Иммобилизация ферментов на твердом носителе лишает их антигенных свойств, поскольку такие белки не индуцируют синтез антител. Выбор оптимального носителя определяется доступностью матрицы и отсутствием у нее раздражающего действия на раневые поверхности и иных токсических свойств, а также возможностью биodeградации или удобством применения.

В настоящий момент используются следующие лекарственные формы фермен-

тов: порошок, мази, комплексы на различных типах носителей (сорбенты, полимеры, текстиль с разными волокнами). При этом используют физическую сорбцию или химические связи (обратимые и необратимые).

Имобилизованный на АЭ-целлюлозе протосубтилин значительно ускоряет очищение и заживление ран, существенно превышая по эффективности растворимые протеазы, которые в растворе теряют свою активность в течение 40—60 мин. Однако они не получили широкого распространения, что может быть связано с относительной дороговизной и низкой эффективностью.

Энзимотерапия – молекулярная хирургия - неопенимая помощь в лечении ран и дополнение к активной хирургической тактике. Низкая устойчивость ферментов не позволяет в полной мере использовать их возможности для ускорения репаративного процесса. Выходом из сложившегося положения является разработка и широкое внедрение в лечебную практику доступных раневых покрытий с иммобилизованными ферментами.

Для решения этой задачи нами проводилось сравнительное исследование различных носителей и методов иммобилизации. В результате разработано семейство перевязочных средств с иммобилизованными формами трипсина. Это потребовало последовательно решить несколько задач:

- исследовать сохранение активности трипсина после иммобилизации,
- исследовать высвобождение и активность трипсина в водной фазе и в модели раневого процесса.

При сравнительном изучении в перспективе промышленного производства недорогого препарата наиболее перспективными показались следующие методы иммобилизации: адсорбция (физическое связывание) и полимеризация.

Адсорбция проводится в жидкой фазе (раствор активного вещества) на любой материал, способный к сорбции (физическому взаимодействию) и образованию водородных и, частично, ионных свя-

зей. К таким материалам относятся целлюлоза, хлопок и др.

Полимеризация может осуществляться в присутствии ферментов или за счет образования комплексных соединений.

Некоторые носители могут подвергаться в ране биodeградации. Сроки разрушения зависят от степени обработки и количества гидроксильных и карбоксильных групп. Биodeградируемые носители удобны для использования при глухом зашивании ран, санации очага в брюшной полости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для тестирования была выбрана модифицированная (окисленная) целлюлоза (5-карбоксицеллюлоза) с разным содержанием карбоксильных групп.

Для поверхностных ран более удобно использование сменных повязок. В качестве основы возможно применение медицинской марли. Однако более перспективным оказалось использование сетчатого трикотажного медицинского полотна (ТУ РБ 300031202.004-2000). Это полотно изготавливается из плетеных нитей, которые образуют сетку с шагом 1 мм, что позволяет равномерно высвобождать иммобилизованные активные компоненты в раневую среду и увеличивает сорбционную емкость повязки.

В качестве основы для иммобилизации выбран полимер акриловой кислоты, которая широко используется в пищевой промышленности, косметологии.

Применяли 2 метода иммобилизации ферментов: сорбция из водной фазы и метод включения фермента в ячейки геля полимера.

Иммобилизацию трипсина на монокарбоксицеллюлозе производили сорбцией из водной фазы в течение суток при 4-6°C. Готовили 0,04 % раствор трипсина с pH=7,6. Образцы равной массы помещали с полным погружением в 10 мл раствора трипсина. Для оценки полноты сорбции производили анализ остаточной протеолитической активности этих растворов.

Для иммобилизации методом вклю-

чения фермента в ячейки геля полимера, после растворения навески полиакрилата в 70% растворе этилового спирта, гель разводили очищенной водой, затем нагревали для удаления этилового спирта. После охлаждения в гель добавляли трипсин кристаллический, тщательно перемешивали и наносили на сетчатое полотно. Приготовленный полимер-лекарственный комплекс сушили лиофильно.

Активность трипсина оценивали по расщеплению низкомолекулярного хромогенного субстрата - а - N -бензоил-Д,1 - аргининпаранитроамилида (БАПНА). Прирост продуктов гидролиза регистрировали по светопоглощению р-нитроанилида при 410 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Остаточная протеолитическая активность рабочих растворов составила для монокарбоксицеллюлозы (МКЦ) с содержанием карбоксильных групп 3; 1,05; 0,9 ммоль/г соответственно $5,09 \pm 3,08$; $33,03 \pm 16,28$ и $42,06 \pm 5,51\%$. Таким образом, наибольшей сорбционной емкостью обладает модифицированная целлюлоза с содержанием карбоксильных групп 3 ммоль/г, которая обеспечивает иммобилизацию 94,91% фермента из водной фазы.

Таким образом, полнота сорбции трипсина целлюлозой зависит от степени ее окисления и количества карбоксильных групп. При высокой степени окисления достигается почти полная сорбция фермента.

После иммобилизации фермента на носителях часть активных центров является заблокированными. Для предварительной оценки действия повязки в ране представляет интерес возможность протеолитического действия фермента без высвобождения в жидкую фазу, где может наступить быстрая инактивация и блокирование активных центров. Структура белка (фермента) при фиксации на носителях приобретает дополнительную устойчивость, что позволяет без разрушения выдерживать термические и химические воздействия.

Для этого необходимо оценить количество иммобилизованного фермента и «проявленную» активность. Определяли активность трипсина в водной фазе после сорбции на носители и сравнивали с активностью исходного «маточного» раствора. Из полученных образцов исследовали равные навески.

Активность исходного раствора трипсина (20 мг на 100 мл) составила 438 ± 18 единиц. С учетом полноты сорбции рассчитывали прогнозируемую активность образцов МКЦ с содержанием карбоксильных групп 3; 1,05; 0,9 ммоль/г. Она составила, соответственно, 413,5; 351,5 и 340,5 единиц. После этого определяли активность на носителях, которая составила 27,6; 3,9; и 1,3%.

Таким образом, установлено, что МКЦ 3 не только сохраняет активность трипсина после высвобождения, но и может обеспечивать протеолитическое очищение раны без высвобождения фермента.

Для прогнозирования протекания раневого процесса критическим является сохранение стабильности фермента в условиях раны (кислая среда) и длительность высвобождения фермента в жидкую фазу. Иммобилизованные ферменты (без высвобождения в раневую среду) действуют в месте контакта, однако могут запускать каскад протеолитических реакций за счет активации тканевых проферментов.

Кроме того, физическая сорбция является обратимой. Через некоторое время между жидкой фазой и носителем устанавливается динамическое равновесие $V(\text{сорбции}) = V(\text{десорбции})$. В дальнейшем скорость десорбции зависит от скорости потребления фермента в раневой среде. Достигнутая концентрация фермента в растворе зависит от характеристик среды (ионная сила раствора, pH) и свойств носителя (сорбента). Существенно сохранение активности фермента в жидкой фазе, т.к. возможна инактивация трипсина в связи с нарушением четвертичной структуры, нагреванием, блокадой активных центров и аутолизом.

Для исследования особенностей протекания высвобождения фермента и прогноза очищающей способности созда-

ваемой повязки предложена модель раневой среды – непрерывный забор образцов из реактора, где жидкой фазой выступает раствор, идентичный тканевой жидкости и плазме.

Для определения десорбции пробы заливали 20 мл солевого раствора, идентичного крови (рН=7,34). С помощью аппарата для встряхивания АП-1013 при температуре 37°C постоянно перемешивали раствор. Пробы по 1 мл забирали через 0,5; 1; 2; 3 и 4 часа.

Рассчитывали процентное соотношение активности фермента при высвобождении в раствор к стандартной активно-

для срабатывания антиферментных систем клеток, тогда как происходит лизис некротизированных тканей. Это также обеспечит отсутствие или уменьшение болей при перевязках больных с трофическими язвами.

Для определения длительности высвобождения трипсина и пролонгации активности трипсина использовали модель полной смены раневого отделяемого (полного удаления при дренировании).

В организации лечения ран приходится учитывать организационные моменты и объективно оценивать возможности медицинского персонала. При местном ле-

Таблица 1.

Характер десорбции трипсина в модели раневого процесса I

Время, часы	МКЦ 3 ммоль/г, % от стандартной активности	Полотно сетчатое с полиакрилатом % от стандартной активности	МКЦ 1,05 ммоль/г % от стандартной активности.	МКЦ 0,9 ммоль/г % от стандартной активности.
0,5	31,9±10,0	19,4±2,8	65,0±14,3	70,7±6,8
1	29,2±9,3	22,6±2,1	59,2±4,1	62,0±6,1
2	26,2±9,7	12,7±1,1	41,6±3,6	80,8±9,2
3	28,9±11,4	11,8±4,6	48,1±1,9	70,9±4,7
4	19,5±11,4	11,5±3,6	45,9±3,6	57,2±2,8

сти в разные моменты времени. При определении в водной среде активности фермента обнаружено различие в динамике десорбции у разных образцов (таблица 1).

Для образцов МКЦ 3 ммоль/г и полиакрилатного комплекса было характерно высвобождение сразу до 30 % иммобилизованного фермента и поддержание активности препарата на стабильном уровне (достижение равновесия сорбции и десорбции и постоянная скорость высвобождения). Таким образом, обеспечивалось постепенное высвобождение фермента и поддержание его активности длительное время.

Для образцов МКЦ 1,05 и 0,9 ммоль/г было характерно быстрое высвобождение 65-70 % иммобилизованного трипсина.

Дозированное высвобождение трипсина позволяет избежать чрезмерного повышения протеолитической активности раневой среды и повреждения жизнеспособных тканей. При длительном умеренном действии трипсина создаются условия

в чечии основным методом являются перевязки с использованием растворов и мазей с лекарственными средствами. В стационарах перевязки производятся 1 раз в 1-2 суток. В то же время действие влажно-высыхающих повязок ограничено 4-6 часами (по другим данным 2-4 часа), ферменты разрушаются в ране через 20-30 минут.

Создаваемое перевязочное средство должно быть удобным в применении и не требовать частой смены повязок, длительно обеспечивать лечебное действие. Оптимальная длительность действия препаратов составляет 20-24 часов.

Использовали модель раневого процесса, при которой полностью меняли жидкую среду, в которую происходила десорбция. Эта модель будет адекватно отражать происходящие процессы в ране при большом количестве отделяемого или его удалении посредством дренажей («вымывание фермента»).

Данный эксперимент проводили с ПСП (сетчатым полотном с полиакрилатным лекарственным комплексом), который в опытах продемонстрировал высокую сорбционную емкость и дозированное высвобождение в жидкую фазу фермента.

Для этого образцы заливали 10 мл физиологического раствора, инкубировали при 37°C и полностью сливали раствор через каждые 2 часа. Эти образцы снова заливали физ. раствором. В слитой жидкости определяли протеолитическую активность. Выполнены измерения через 2, 4, 6, 8, 24 часа (таблица 2).

Таблица 2.

Высвобождение трипсина в модели раневого процесса II

Время, часы	средняя активность	% от стандартной активности
2	168±2,8	30,5±0,5
4	84±7,1	15,3±1,3
6	81±2,1	14,7±0,4
8	84±12,7	15,3±2,3
24	28±0,0	5,1±0,0
	всего	80,9±0,9%

Полученную активность переводили в относительные величины и сравнивали со стандартной активностью.

Таким образом, в модели полной смены раневого отделяемого за 24 часа произошло высвобождение 80,9±0,9% иммобилизованного фермента.

После высвобождения значительного количества фермента в первые часы опыта происходила стабилизация скорости его десорбции, которая была одинаковой в 4-8 часы опыта. Установлено, что лекарст-

венная композиция с полиакрилатами обладает пролонгированным протеолитическим действием.

При хранении препарат может терять свою активность. Поэтому проводили исследование сохранения активности трипсина при иммобилизации методом включения фермента в ячейки геля полиакрилата в разные сроки.

При оценке сохранения активности полученные данные соотносили с активностью 2 мг трипсина. 0,2 мл 0,04% раствора трипсина обладает активностью 550 единиц, т.е. активность 40 мг трипсина принимается за 275000, а 2 мг за 13750 единиц (таблица 3).

Таким образом, на полотне после изготовления лекарственного комплекса сохраняется 95±3% от активности наносимого препарата.

Приготовленные образцы хранили в флаконах из темного стекла при температуре 4-6°C в течение года. Затем повторно определяли активность трипсина и сравнивали с активностью 2 мг трипсина и предыдущими измерениями (таблица 4). Таким образом, на полотне сохраняется 92,4±3,7% от активности наносимого препарата или 97,0±4,0% активности годичной давности.

ВЫВОДЫ

Проведенные лабораторные тесты позволили разработать технологию производства перевязочных средств и иммобилизации лекарственных препаратов.

В качестве основы для иммобилизации выбрано сетчатое трикотажное медицинское полотно с полиакрилатным комплексом и монокарбоксилцеллюлоза с высокой степенью окисления (3 ммоль/г), которые продемонстрировали максимальную полноту сорбции. Выбранные методы иммобилизации фермента обеспечивали сохранение активности препарата после высвобождения в раневую среду и на носителях. Для прогнозирования характера десорбции фермента и скорости очищения ран в реальных условиях проводилась оценка активности трипсина в различных моделях раневого процесса, что продемон-

Таблица 3.

Сохранение активности трипсина при иммобилизации.

масса образца, мг	активность образца, ед	% от активности 2 мг трипсина
640	13546,7±178,8	98,5±1,3
690	12972,0±330,0	94,3±2,4
690	12814,3±288,8	93,2±2,1
710	12661,7±495,0	92,1±3,6
740	13531,4±495,0	98,4±1,2

стрировало пролонгацию действия трипсина и его высвобождение в течение суток

Разработан метод включения фермента в ячейки геля полиакрилата, кото-

8.Торчилин В.П. Имобилизованные ферменты в медицине. М.: ВНИИЦ, 1998.- 198 с.

9.Allcock Harry R., Pucher Shawn R., Viss-

Таблица 4.

Сохранение активности трипсина через год.

масса образца мг	Активность образца, ед	% от активности 2 мг трипсина	% сохранения актив- ности
640	12251,4±288,8	89,1±2,1	90,4±2,4
690	12420,0±440,0	90,3±3,2	95,7±3,5
690	13110,0±192,5	92,3±1,4	99,1±1,5
710	12678,6±151,3	91,5±1,1	99,3±1,2
740	13690,0±123,8	98,7±0,9	100,3±0,9

рый обеспечивает высокую сохранность активности фермента на носителях в технологическом процессе и хранении.

ЛИТЕРАТУРА

1.Афиногенов Г.Е., Панарин Е.Ф. Анти-микробные полимеры. СПб: Гиппократ, 1993, 264 с.

2.Березин И.В. Исследования в области ферментативного катализа и инженерной энзимологии. М.: Наука, 1999.-384 с.

3.Глянцев С.П., Саввина Т.В., Заяц Т.Д. Сравнительное изучение активное протеолитических ферментов, применяемых в хирургии для очищения гнойных ран // Бюлл. экспер. биол. мед. - 1996. -N 6. - С. 716-720.

4.Коган А.С., Соботович В.Ф. Имобилизованные протеиназы: опыт применения в торакальной хирургии // Современные технологии в торакальной хирургии, - М.: 1995. - С. 89-91.

5.Коршак В.В., Штильман М.И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. М.: Наука, 1998. 281 с.

6.Кузин М.И., Костюченко Б.М. Раны и раневая инфекция. М.: Медицина, 1990.- 592 с.

7.Попов Е.М. Структура и функция белка. Ин-т биоорг. химии РАН;Ред.Т.И.Сорокина - М.: Наука, 2000.- 482 с.

cher Karyn B., Activity of urea amidohydrolase immobilized within polyhydrogels Biomaterials. - 1994. - 15, N 7. - P. 502-506.

10. Borman Stu Enzymes immobilized in polymeric microcapsule arrays Chem. and Eng. News. - 1994. - 72, N 22. - P. 17.

11. Neurath H. Proteolytic enzymes, part and future // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1999. - Vol. 96. - P. 10962-10963.

12. Tyagi Renu, Singh Dinesh K., Gupta Munishwar N. Reversible immunobilization of chemically modified trypsin on DEAE-cellulose//Biotechnol. and Appl. Biochem.. - 1994. - 20, N 1. - P. 93-99.

13. Varalakshmi P., Lathika K.M., Raghavan K.G., Singh B.B. Altered physicochemical characteristics of polyethylene glycol linked beet stem oxalate oxidaseBiotechnol. and Bioeng.. - 1995. - 46, N 3. - P. 254-257.

14. Walt David R., Agayn Vanetka I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde// Trends Anal. Chem.. - 1994. - 13, Suppl. n 2. - P. 425-430.

